

## 2. Scope of Claims

1) A thiol group-containing polymer obtained by introducing an oxirane group into a water-insoluble polymer containing a hydroxyl group, and treating the resulting polymer containing an oxirane group with a water-soluble salt of hydrogen sulfide.

2) A polymer according to claim 1, wherein the polymer containing a hydroxyl group is a polymer based on a carbohydrate, or a polymer based on methacrylamide, N-methylene-bis-methacrylamide, a glycidyl methacrylate/polyethylene glycol derivative or pentaerythritol dimethacrylate.

3) A polymer according to claim 1, wherein the polymer containing a hydroxyl group is an agarose gel.

4) A polymer according to claim 1, wherein the salt of hydrogen sulfide is an alkaline metal salt or an alkaline earth metal salt.

5) A polymer according to claim 1, wherein the polymer containing an oxirane group contains a derivative of acrylic acid or methacrylic acid.

6) A polymer according to claim 1, wherein the water-insoluble polymer containing a hydroxyl group comprises pentaerythritol, a derivative of methacrylic acid and polyethylene glycol, and also is a copolymer crosslinked with divinylbenzene, and an oxirane group is introduced by reacting this copolymer with epichlorohydrin, and the resulting copolymer is treated with sodium sulfide.

7) A polymer according to claim 1, wherein the water-insoluble polymer containing a hydroxyl group is a polymer based on a derivative of methacrylic acid (Sepabeads®), and an oxirane group is introduced by reacting this polymer with butanediol diglycidyl ether, and the resulting polymer is treated with sodium sulfide.

8) A process for producing a thiol group-containing polymer, comprising: reacting a water-insoluble polymer containing a hydroxyl group with 1-chloro-2,3-epoxypropane (epichlorohydrin) or 1,4-bis-(2,3-epoxypropoxy)-butane at 40 to 50°C for 1 to 4 hours, thereby introducing an oxirane group into the polymer; washing the resulting polymer with water; taking the polymer into an aqueous solution; treating the polymer with a water-soluble sulfide at 0 to 70°C for 2 to 48 hours; and washing the resulting polymer with water or a dilute acid.

9) Use of a polymer according to claim 1 for the fixation of an enzyme, a proenzyme, an antibody or an antigen, and the chromatography of a material that interacts with a mercapto group.

10) A polymer according to claim 1 for the bonding of a thiol group-containing material after activation with the use of a disulfide.

11) Use of a polymer according to claim 1 for the purification of  $\alpha_1$ -antitrypsin.

## ⑫ 公開特許公報(A)

昭64-66213

⑤Int.Cl.<sup>4</sup>C 08 F 8/34  
8/08  
20/00

識別記号

MHQ  
MGD

庁内整理番号

7311-4J  
7311-4J

⑬公開 昭和64年(1989)3月13日

審査請求 未請求 請求項の数 11 (全5頁)

⑭発明の名称 チオール基を含有するポリマーおよびその製法

⑮特 願 昭63-194740

⑯出 願 昭63(1988)8月5日

優先権主張 ⑰1987年8月8日⑱西ドイツ(DE)⑲P37 26 454.0

⑳発 明 者 ヴェルナー・シュテューバー ドイツ連邦共和国デー-3551ラントール。ケルバーヴェーク12

㉑発 明 者 ハルトムート・レーベルマン ドイツ連邦共和国デー-7801シャルシュタット。モースヴァルトシュトラッセ7ベアー

㉒出 願 人 ベーリングヴェルケ・アクチエンゲゼルシャフト ドイツ連邦共和国マルブルク/ラーン(番地なし)

㉓代 理 人 弁理士 高木 千嘉 外2名

## 明 細 書

のポリマー。

1.発明の名称 チオール基を含有するポリマー  
およびその製法

4) 硫化水素の塩がアルカリ金属塩またはアルカリ土類金属塩である請求項1記載のポリマー。

## 2.特許請求の範囲

1) ヒドロキシル基を含有する水不溶性ポリマー中にオキシラン基を導入しそしてオキシラン基を含有するポリマーを硫化水素の水溶性塩で処理することにより得られるチオール基含有ポリマー。

5) オキシラン基を含有するポリマーがアクリルまたはメタクリル酸誘導体を含有する請求項1記載のポリマー。

2) ヒドロキシル基を含有するポリマーが炭水化物に基づくポリマーであるか、またはメタクリルアミド、N-メチレン-ビス-メタクリルアミド、グリシジルメタクリレート/ポリエチレングリコール誘導体またはペンタエリトリールジメタクリレートに基づくポリマーである請求項1記載のポリマー。

6) ヒドロキシル基を含有する水不溶性ポリマーが、ペンタエリトリール、メタクリル酸誘導体およびポリエチレングリコールからなりかつジビニルベンゼンで架橋された共重合体であり、オキシラン基がこの共重合体をエピクロロヒドロリンと反応させることにより導入され、そして硫化ナトリウムで処理される請求項1記載のポリマー。

3) ヒドロキシル基を含有するポリマーがアガロースゲルであることからなる請求項1記載

7) ヒドロキシル基を含有する水不溶性ポリマーがメタクリル酸誘導体(Sepabeads®)に基づくポリマーであり、オキシラン基がこのポ

リマーをブタンジオールジグリシジルエーテルと反応させることにより導入され、そして硫化ナトリウムで処理される請求項1記載のポリマー。

8) ヒドロキシル基を含有する水不溶性ポリマーを40~50℃で1-クロロ-2,3-エポキシプロパン(エピクロロヒドリン)または1,4-ビス-(2,3-エポキシプロポキシ)-ブタンと1~4時間反応させて、それによりオキシラン基をポリマー中に導入させ、ポリマーを水洗し、水溶液中にとり、0~70℃で2~48時間水溶性硫化物で処理しそしてポリマーを水または希酸で洗浄することからなるチオール基含有ポリマーの製法。

9) 酵素、プロ酵素、抗体または抗原の固定への、およびメルカプト基と相互作用する物質のクロマトグラフィーへの請求項1記載のポリマーの使用。

値する。すでに知られており従って従来法に相当するものは、ホモシステインチオラク톤を用いるポリマー誘導体形成、予めブロムシアンで活性化されたグルタチオンとの結合ならびにエピクロロヒドリンでの活性化および続く還元を伴うチオ硫酸塩との反応、のみならずジチオトレイトールとオキシラン基との反応である(R. Axén 氏他、Acta Chemica Scan. B 29, 471~474(1975))。

しかしながらこれらチオール含有ポリマーならびにそれらの製法には欠点があつて、それゆえ改善が望まれている。その理由の一つはマトリックスが炭水化物構造を有するゆえに機械的影響に対して感受性でありかつ微生物により攻撃されうることである。もう一つの理由はスルフヒドリル基の導入法が高価であるかまたは煩雑でありそして多くの場合に不安定な結合を生ずるからである。

10) ジスルフィッドを用いる活性化後に、チオール基含有物質の結合のための請求項1記載のポリマー。

11) アルファ $\alpha$ -アンチトリブシンの精製のための請求項1記載のポリマーの使用。

### 3. 発明の詳細な説明

本発明はチオール基を含有するポリマー、その製法およびその使用に関する。

メルカプト基で誘導体形成されたポリマー担体物質は大変重要である、何故ならその物質により一方では通常スルフヒドリル基と相互作用する物質が精製され、他方では物質がスルフヒドリル基に不可逆的に固定されうるからである。かかる物質は例えば酵素、抗体、プロ酵素または抗原でありうる。担体マトリックスとしてはこれまで特にアガロースの誘導体がいわれてきた。これらポリマー担体の製造においてはスルフヒドリル官能基の化学的導入が特に注目に

それゆえ、本発明の目的はチオール基を含有するポリマーを簡単にかつ経済的に製造しうる方法を開発することであつた。その他に形成される化学的結合が高い安定性を有するという条件を満たす必要があつた。

本発明の目的はまた、誘導体形成に用いられるマトリックスに起因して優れた機械的および化学的安定性を有するチオール基含有ポリマーを製造することであつた。

今、驚くべきことに、オキシラン基で誘導体形成されたポリマーが硫化水素の水溶性塩と反応して固定されたスルフヒドリル官能基を形成することが見出された。

本発明はヒドロキシル基を含有する水不溶性ポリマー中にオキシラン基を導入しそしてオキシラン基を含有するポリマーを硫化水素の水溶性塩好ましくはアルカリ金属またはアルカリ土類金属塩で処理することにより得られるチオー

ル基含有ポリマーに関する。

ヒドロキシル基を含有するポリマーとしては炭水化物に基づくポリマー例えばアガロースゲルまたはデキストランゲルあるいはメタクリルアミド、N-メチレン-ビス-メタクリルアミド、グリシジルメタクリレート/ポリエチレングリコール誘導体およびペンタエリトリールジメタクリレートに基づくポリマーが適当である。

化学的性質が共重合体としての特徴を有し、アクリル酸またはメタクリル酸誘導体から構成されそしてオキシラン基を有するポリマーがチオール基含有ポリマーの製造に適する。かかる共重合体のモノマー成分の例をあげれば、メタクリルアミド、N-メチレン-ビス-メタクリルアミド、グリシジルメタクリレート、グリシジルメタクリレート/ポリエチレングリコール誘導体またはペンタエリトリール

は水性緩衝溶液中にとる。その場合通常樹脂1kg当り500ml〜3ℓ好ましくは約1ℓが添加される。緩衝液としては塩溶液例えばpH4〜13を有する磷酸ナトリウム緩衝液、クエン酸ナトリウム緩衝液またはヘス緩衝液が用いられうる。好ましくはポリマー1kg当り0.25モル炭酸水素ナトリウム溶液1ℓが添加される。

次に水溶性硫化物または硫化水素化物、好ましくは硫化アルカリ金属の10〜200gを加える。特に好ましくは硫化ナトリウム $\times 9H_2O$  70〜80gを加え、そして反応混合物を0〜70℃好ましくは35〜45℃で攪拌する。反応時間としては2〜48時間、好ましくは12〜14時間が選択される。次にポリマーを水および/または0.5ml/100ml酢酸で洗浄する。

本発明はまたヒドロキシル基を含有する水不溶性ポリマーを40〜50℃で1-クロロ-2,3-エポキシプロパン(エピクロロヒドリン)また

メタクリル酸誘導体である。特にフラクトゲル(Fractogel)またはセパビーズ(Sepabeads)なる名称の下に市販されている樹脂が適当である。

これら水不溶性樹脂のヒドロキシル基は知られた方法例えばEP-A-0,203,463号の記載に従い1-クロロ-2,3-エポキシプロパン(エピクロロヒドリン)または1,4-ビス-(2,3-エポキシプロポキシ)-ブタンと反応させて、それによりオキシラン基をポリマー中に導入する。

エポキシド化は、例えば水で湿らせたポリマー1kgを水1500mlおよび2N水酸化ナトリウム溶液650ml中に懸濁させそしてこの懸濁液を高められた温度例えば40〜50℃でエピクロロヒドリン200mlと反応させることにより行われる。1〜4時間後にポリマーを水洗しそして吸引乾燥する。

次にオキシランを含有するポリマーを水また

は1,4-ビス-(2,3-エポキシプロポキシ)-ブタンと1〜4時間反応させて、それによりオキシラン基をポリマー中に導入させ、ポリマーを水洗し、水溶液中にとり、0〜70℃で2〜48時間水溶性硫化物で処理しそしてポリマーを水または希酸で洗浄することからなるチオール基含有ポリマーの製法にも関する。

本発明による好ましいポリマーは、ペンタエリトリール、メタクリル酸誘導体およびポリエチレングリコールからなりかつジビニルベンゼンで架橋された共重合体をエピクロロヒドリンと反応させることによりこの共重合体中にオキシラン基を導入し、そして硫化ナトリウムで処理することにより得られうるポリマーである。

本発明によるさらに好ましいポリマーは、メタクリル酸誘導体(Sepabeads®)に基づくポリマーをブタンジオールジグリシジルエーテルと

反応させることによりこのポリマー中にオキシラン基を導入し、そして硫化ナトリウムで処理することにより得られうるポリマーである。

前記方法によりチオール官能基を備えたポリマー担体はそれらが機械的および化学的に安定であるゆえに酵素、プロ酵素、抗体または抗原の固定、ならびにメルカプト基と相互作用する物質のクロマトグラフィーに特に好ましくかつ適する。

さらに、かくして製造されたチオール含有ポリマーは予めジスルフィッドでの活性化後に、チオール基を含有する物質例えばタンパク質と反応してジスルフィッド交換させるのにも適する。それによりかかるタンパク質は濃縮されうるしまたはポリマーから分離され、従って精製されうる。重合体状メルカプト基の活性化に特に適するジスルフィッドの例をあげれば、2,2'-ジビリジルジスルフィッド、ビスー(2-ビ

リジル-n-オキサイド)-ジスルフィッド、および5,5'-ジチオビスー(2-ニトロ安息香酸)である。

本発明によるポリマーはα,ω-アンチトリブシンの精製に好都合に使用されうる。

以下の実施例により本発明を説明する。

#### 実施例 1

フラクトゲル(Fractogel®)に基づくチオール含有ポリマーの製造

ペンタエリトリール、メタクリル酸誘導体およびポリエチレングリコールからなる共重合体フラクトゲルHW-65(F)(Toyo Soda社製)1000mlに水350mlおよび5N水酸化ナトリウム溶液275mlを加え、この混合物を45℃に加温した。これにエピクロロヒドリン200mlを加え、この温度で2時間攪拌した。この混合物を濾過し、そして洗液のpHが7となるまで水洗した。吸引乾燥した樹脂を0.2モルの炭酸水素ナトリウム

化

実施例1に記載されるようにして製造されたチオール含有フラクトゲルHW-65 500mlを、50ミリモル/lのトリス/HClおよび150ミリモル/lのNaClを含有するpH7.5の緩衝液Aで平衡とした。次にこの樹脂物質を緩衝液A+1.5ミリモル/lの2,2'-ジチオビスー(ビリジン-N-オキサイド)1mlずつと4回室温で320分間インキュベーションしそして次に再び緩衝液Aで洗浄した。かくして活性化された樹脂物質はここで例えばジスルフィッド交換反応に使用できる。

#### 実施例 4

ジー(2-ビリジル)ジスルフィッドを用いるチオール含有セバビーズHG 05の活性化

実施例2に記載されるようにして製造されたチオール含有セバビーズHG 05の500mlを実施例3に記載される条件下に1.5ミリモル/lのジ

#### 実施例 2

セバビーズ(Sepabeads®)(Mitsubishi社製)に基づくチオール含有ポリマーの製造

NaBH<sub>4</sub> 2gを含有する0.6N NaOH 1000ml中にセバビーズHG 05 1000mlを懸濁させた。次にこれにブタンジオールジグリシジルエーテル1000mlを加え、この懸濁液を室温で8時間攪拌した。エポキシ活性化されたセバビーズHG 05物質をガラスフリット上、水15lを用いて洗浄した。これを実施例1と同様にしてNa<sub>2</sub>S×9H<sub>2</sub>Oと反応させた。

#### 実施例 3

2,2'-ジチオビスー(ビリジン-N-オキサイド)を用いるチオール含有フラクトゲルの活性

-(2-ビリジル)-ジスルフィッドを用いて活性化した。

#### 実施例 5

##### $\alpha_1$ -アンチトリプシンの精製

ヒト血漿500mlを30ミリモル/lのメルカプトエタノールを含有する水1000mlで希釈し、室温で1時間インキュベーションしそして次に硫酸アンモニウムを用い50%(w/v)飽和と75%(w/v)飽和の間の分割沈澱にかけた。50~75%(w/v)残留物を50ミリモル/lのトリス、200ミリモル/lのNaClおよび1ミリモル/lのEDTAを含有するpH8.0の溶液中に溶解させ、そして500mlのACA® 202カラムでクロマトグラフィーした。 $\alpha_1$ -アンチトリプシンを含有するフラクションを合しそして2,2'-ジチオビス-(ビリジン-N-オキサイド)で活性化したデオール-フラクトゲルカラム(100ml)に加えた。このカラムを同じ緩衝液で洗いそして $\alpha_1$ -アン

チトリプシンを10ミリモル/lのジチオトレイトールを含有する溶液を用いて溶離した。かくして得られた $\alpha_1$ -アンチトリプシンは実質上不純物を含有していなかった。

特許出願人 ベーリングヴェルケ・アクチエン  
ゲゼルシャフト

代理人 弁理士 高 木 千 嘉



外 2 名